

Adsorption von Coli-Phagen

Behandlung von Seren mit Adsorbentien, II. Mitteilung

Von W. STEPHAN und G. MAY

Aus der Wissenschaftlichen Abteilung der „Biotest“-Serum-Institut GmbH, Frankfurt/Main (Leiter: Prof. Dr. L. Róka)
und dem Hygiene-Institut Frankfurt/Main (Leiter: Prof. Dr. H. Knothe)

(Eingegangen am 17. Oktober 1967)

Coli-T₂-Phagen in Menschen-Serum werden durch AEROSIL-Behandlung so verändert, daß ein großer Teil durch EKS-Filter zurückgehalten wird. Eine anschließende UV-Bestrahlung bewirkt die quantitative Beseitigung der restlichen Coli-T₂-Phagen.

Coli-T₂-phage in human serum was modified by treatment with AEROSIL, so that a large proportion could be removed by filtration through an EKS filter. The remaining Coli-T₂-phage was removed by UV-irradiation.

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen über die Einwirkung von Aerosil auf Seren (1) interessierte die Frage, ob sich Phagen durch Adsorption aus Human-Seren entfernen lassen. Die Versuche wurden mit Coli-T₂-Phagen durchgeführt.

Ergebnisse

Aerosil-Behandlung

Suspensionen von Coli-Phagen in physiol. Kochsalzlösung (Titer 10⁸/ml) werden durch intensives Rühren mit 2% Aerosil vollständig adsorbiert. Diese Adsorption von Coli-Phagen an Aerosil wird durch Proteine offenbar verhindert, da eine Beseitigung von Phagen aus Menschen-Seren durch Aerosil-Adsorption nicht gelingt (Tab. 1).

Tab. 1
Absorption von Coli-Phagen an Aerosil

Nr.	Medium	Phagenkonzentration pro ml Serum Ausgang	nach Adsorption
250	0,9proz. NaCl	5,7 × 10 ⁸	0
239	Human-Serum	1,8 × 10 ⁸	9,0 × 10 ⁷

Dieses Ergebnis wird bekräftigt durch den Befund von AUERSWALD und EIBL (2), demzufolge die Behandlung von Asbest und Cellulosefiltern mit Proteinlösungen die Adsorption von Viren bei der Filtration verhindert. Führt man jedoch anschließend an die für sich allein wirkungslose Aerosil-Behandlung eine Filtration durch Seitz-Sterilfilter durch, so ist im Filtrat der Phagentiter um den Faktor 10⁴ vermindert. Sterilfiltration eines phagenhaltigen Serums ohne Aerosil-Behandlung beeinflusst den Phagentiter kaum (Tab. 2).

Tab. 2
Verminderung der Phagenkonzentration durch Aerosilbehandlung und anschließende Sterilfiltration

Nr.	Ausgang	Phagenkonzentration pro ml Serum nach Filtration	nach Adsorption ohne Filtration	nach Adsorption plus Filtration
106	3,7 × 10 ⁷	4,2 × 10 ⁶	1,9 × 10 ⁷	2,3 × 10 ⁸
115	9,5 × 10 ⁷	1,0 × 10 ⁷	1,7 × 10 ⁷	2,2 × 10 ⁸
166	3,5 × 10 ⁷	—	1,0 × 10 ⁷	3,2 × 10 ⁸

Daraus ergibt sich, daß Aerosil in Gegenwart von Protein die Phagen nicht adsorbiert, jedoch in charak-

teristischer Weise verändert. Möglicherweise besteht diese Veränderung in einer Aggregation der Phagen: Die Partikel werden vergrößert und lassen sich durch geeignete Filter zurückhalten.

Da *nur* die Kombination von Aerosil-Behandlung und Filtration die Phagenkonzentration wesentlich herabsetzt, interessierte die Filterkapazität des Filters für diese „aggregierten Phagen“. Die Versuche ergaben, daß die Filterkapazität eines EKS-1-Sterilfilters für „aggregierte Phagen“ in der gleichen Größenordnung liegt wie die Kapazität bezüglich Bakterien: So wurde zum Beispiel 1 l eines Phagenserums nach Aerosil-Behandlung durch ein 6 cm Filter (Oberfläche: 30 cm²) gegeben, ohne daß eine deutliche Erschöpfung des Filters nachweisbar war (Tab. 3).

Tab. 3
Filterkapazität für „aggregierte Phagen“

Nr.	Ausgang	Phagenkonzentration pro ml Serum nach 50 ml Adsorption + Filtration	nach 200 ml	nach 1000 ml
114	9,5 × 10 ⁷	2,2 × 10 ²	2,3 × 10 ³	1,0 × 10 ³
194	2,0 × 10 ⁸	—	2,4 × 10 ²	1,0 × 10 ²

Kombination von Aerosil-Behandlung, Filtration und UV-Bestrahlung

Da es also gelingt, durch Aerosil-Behandlung und Sterilfiltration den Phagentiter um einen deutlichen Betrag zu senken, und da auch UV-Bestrahlung eine Reduktion von Phagen bewirkt (3), wurde geprüft, ob durch Kombination der beschriebenen Technik und UV-Bestrahlung Phagen quantitativ beseitigt werden. Die Versuche zeigten, daß Phagen durch diese kombinierte Behandlung quantitativ entfernt werden (Tab. 4).

Tab. 4
Entfernung von Phagen durch Kombination von Aerosil-Behandlung, Sterilfiltration und UV-Bestrahlung. Phagenkonzentration 0/ml Serum bedeutet: in 500 ml konnte kein Phage mehr nachgewiesen werden

Nr.	Ausgang	Phagenkonzentration pro ml Serum nach Adsorption + Filtration	nach Adsorption + Filtration + UV-Bestrahlung
199	1,0 × 10 ⁷	1,0 × 10 ³	0
203	2,0 × 10 ⁷	1,0 × 10 ³	0
207	3,0 × 10 ⁷	5,0 × 10 ²	0

Uns kam es besonders darauf an, daß eine Beseitigung der Phagen wirklich quantitativ erfolgte, d. h. daß auch in einem größeren Pool kein Phage mehr zurückbleibt. Zu diesem Zweck wurde ein Anreicherungstest angewandt, nach dem 500 ml Untersuchungsmaterial völlig ausgetestet wurden.

Die immunoelektrophoretische Analyse zeigte, daß durch UV-Bestrahlung (2 mWatt/cm²/Min.) keine Veränderung der Serumproteine auftritt (Abb. 1).

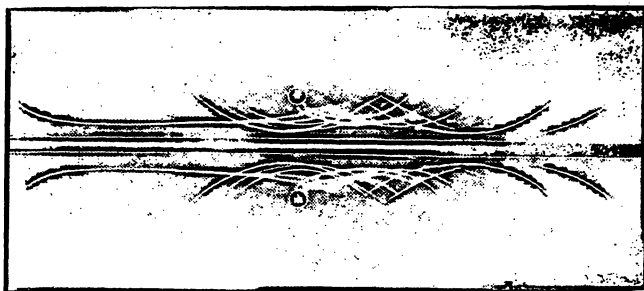


Abb. 1

Immunoelektrophoretische Auftrennung von Aerosil-behandeltem (oben) bzw. Aerosil-behandeltem und UV-bestrahltem Serum vom Menschen (unten). Darstellung mit Anti-Humanserum vom Pferd

Bestätigt wurde dieser Befund durch das Ergebnis von chronischen Verträglichkeitsprüfungen, die zeigten, daß die hervorragende Verträglichkeit von Aerosil-behandeltem Seren (1) durch UV-Bestrahlung nicht beeinträchtigt wird.

Kombination von β -Propiolacton-Behandlung und UV-Bestrahlung

Lo GRIPPO (4) benutzt die Beseitigung von Coli-Phagen, um das von ihm angegebene Verfahren zur Herstellung von Hepatitisvirus-freiem Serum laufend zu überprüfen. Dieses Verfahren verwendet die Kombination von β -Propiolacton-Behandlung und UV-Bestrahlung.

Wir konnten die Ergebnisse von Lo GRIPPO voll bestätigen (Tab. 5), nach denen eine Behandlung von Phagenserum (Phagentiter $> 10^6$) mit 0,3 g/100 ml β -Propiolacton nur einen Teil der Phagen beseitigt, jedoch die Kombination von β -Propiolacton-Behandlung und UV-Bestrahlung zur quantitativen Beseitigung der Phagen führt.

Vergleicht man die hier beschriebene Methode (Tab. 4) mit der von Lo GRIPPO, so zeigt sich, daß nach beiden

Tab. 5
Entfernung vom Phagen durch Kombination von β -Propiolacton-Behandlung und UV-Bestrahlung

Nr.	Ausgang	Phagenkonzentration pro ml Serum	
		0,3% β -Propiolacton	0,3% β -Propiolacton + UV-Bestrahlung
5	$3,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^4$	0
15	$3,3 \times 10^8$	$3,1 \times 10^3$	0
255	$5,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^3$	0

Verfahren hohe Coli-Phagenkonzentrationen quantitativ aus Human-Seren entfernt werden.

Die mitgeteilten Befunde eröffnen daher im Zusammenhang mit den Ergebnissen von Lo GRIPPO eine neue Möglichkeit zur Herstellung von Hepatitisvirus-freien Seren.

Beschreibung der Versuche

Adsorption und Filtration

100 ml frisches Humanserum werden mit 1 ml Phagenkonzentrat versetzt, die Positivkontrolle entnommen, 2 g Aerosil 2491/380 zugefügt und 4 Std. bei 45° gerührt, wobei ein Verspritzen des Phagenserums peinlichst zu vermeiden ist.

Danach wird 20 Min. bei 5000 U./Min. zentrifugiert und durch Seitz-EKS-1-Filter sterilfiltriert.

Phagennachweis

Die Phagentitration wird in üblicher Weise durch Herstellung von Verdünnungsreihen und Auszählen der Plaques nach der Agar-guß-Technik durchgeführt.

Zum qualitativen Nachweis von wenigen Phagen in größeren Serumpools wurde wie folgt gearbeitet:

Die auf Phagengehalt zu prüfende Serummenge (z. B. 500 ml) wird in Portionen von je 100 ml in Erlenmeyerkolben verteilt und zur Ausschaltung der bakteriziden Wirkung mit 200 ml Nährbouillon verdünnt. Anschließend wird mit *E. coli* infiziert und zur *E. coli*- bzw. Phagenvermehrung für 24 Std. bei 37° inkubiert. Aus jedem der Kolben wird eine Probe von 10 ml entnommen und zur Entfernung der Bakterien zentrifugiert. Im Überstand werden die vermehrten Bakteriophagen in der Agar-guß-Technik nachgewiesen.

Als Kontrolle der Anreicherungstechnik dient eine gleich große Serumprobe (z. B. 500 ml), die ebenfalls mit einer kleinen Zahl Phagen infiziert wird. Verteilung auf Portionen zu 100 ml, Infektion mit *E. coli* usw. erfolgt wie oben beschrieben. In diesen Proben muß eine Phagenvermehrung auftreten.

Immunoelektrophorese

Die Immunoelektrophorese wird in der üblichen Weise nach SCHEIDEGGER unter Verwendung von Anti-Humanserum vom Pferd („BIOTEST“) durchgeführt.

Frl. E. HAUG und Frl. H. DRÄGER danken wir für ihre technische Assistenz.

Literatur

1. STEPHAN, W. und L. RÓKA: diese Z. 6, 186 (1968). — 2. Deutsche Patentausschreibung 1150178: Österreichisches Institut für Haemoderivate Wien. — 3. HARTMAN, F. W., G. A. LO GRIPPO, J. G. MATEER und J. BARRON, Hepatitis Frontiers; Henry Ford

Hospital Symposium Detroit, October 1956, Chapter 33, p. 413, Little Brown and Comp. Boston (1957). — 4. LO GRIPPO, G. A., Vortrag gehalten auf dem 4. Internationalen Kongreß Infectious Diseases, München, April 1966.

Dr. W. Stephan
6000 Frankfurt/M.-Niederrad
Flughafenstr. 4